

主 論 文

Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods

(ホルマリン固定パラフィン包埋組織からの抽出法毎の経年変化に伴う DNA 分解の評価)

【緒言】

臨床組織サンプルは、通常ホルマリン固定後、病理検査のためパラフィン包埋される。そのため現在、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から DNA を抽出する様々な方法が開発されている。近年、次世代シーケンサーをはじめとした新規遺伝子解析技術の発展がみられており、長期保管した FFPE 組織ライブラリの使用価値は増加している。しかしながら、長期のホルマリン固定はタンパク質と DNA の架橋を引き起こし、ヌクレオチドの配列を損傷する。したがって、FFPE 組織からの DNA 抽出方法をそれぞれ評価し、研究目的に最もふさわしい方法を選択することが重要である。本研究において、我々は 2 つの異なる DNA 抽出技術を用いて得られた DNA の、質・純度・収率および保存期間に伴う DNA の断片化を評価した。

【材料と方法】

臨床検体は、外科的に切除された 10mm 以上の大きさの肺腺癌 25 例から得た。これらは、2002・2005・2008・2011・2014 年に得られたもので、各年からランダムに 5 つの FFPE 組織および新鮮凍結組織を用いた。FFPE 組織は切除後に室温で最長 2 日の間 10%のホルマリンに固定し、パラフィンで包埋された後に室温で保存されていたもので、新鮮凍結組織は肺切除の後すぐに凍らせた後 -80° C で保存していたものである。

施設内倫理委員会の承認と、各々の患者の説明に基づく同意は書面で得た。

FFPE 組織からの DNA の抽出は、5 μ m の厚さに切り出し、腫瘍部だけを選んでマイクロチューブに移し、QIAamp DNA FFPE 組織キット (QIA) と WaxFree DNA 抽出キット (WAX) を用いて行った。新鮮凍結組織からの DNA 抽出はフェノール-クロロホルム法を用いた。

抽出された DNA の定量は、紫外線吸収度測定 (LabChip® DS)・蛍光強度測定 (Qubit® 2.0 Fluorometer and Qubit® dsDNA HS Assay Kit)・qPCR (KAPA hgDNA Quantification and QC Kit) の 3 つの方法によって行った。

DNA の質は 260nm と 280nm の吸収度比 (A260/280) と、qPCR において同一部位の長さが異なる 41bp・129bp・305bp をそれぞれ定量し、その比を Q129/Q41 および Q305/Q41 として求めた Q スコアによって評価した。この Q スコアからは、PCR 可能な DNA 分子がどの位のサイズまで存在しているかを推定することが可能である。

EGFR L858R 突然変異は、PCR ダイレクトシーケンスを用いて確認した。プライマーに、フォワード 5'-GCAGCCAGGAACGTACTG-3'、リバーズ 5'-GCCTCCTTCTGCATGGTATT-3'を用い、得られた PCR のプロダクト長は 108bp であった。

統計処理は GraphPad バージョン 6.0.3, J を用いて、ウィルコクソン検定、マン-ホイットニー U テストにより行った。P 値で 0.05 未満のものを統計的に有意であることとした。

DNA 収率において、WAX は QIA より優れていた

WAX による DNA の収率は、QIA による DNA の収率よりも紫外線吸収度測定・蛍光強度測定のいずれの評価でも高かった。qPCR 方法では、Q41 で WAX が有意差を持って高かったが、Q129 および Q305 では有意差を示さなかった。

DNA の質において、QIA は WAX より優れていた

QIA によって得られた DNA の質は、WAX によって得られた DNA よりも平均 A260/280 値が有意差をもって高かった。これは WAX で得られた DNA は断片化が多く、QIA によって抽出したよりはるかに多くの不純物が混在していることを示している。Q スコアの平均では、QIA によ

って得られた DNA の Q129/Q41 は WAX よりもかなり高かったが、Q305/Q41 は差が見られなかった。これは、QIA と WAX のどちらを使用しても塩基対が 305 bp よりも小さく断片化されたことと、QIA によって抽出された DNA の塩基対が WAX で得られたものよりも 129 bp 以上 305bp 未満の大きさで多かったことを示す。

長期保存により、抽出した DNA は断片化している

紫外線吸収度による DNA 収率に関しては、QIA と WAX 共に平均 A260/280 値で評価した場合、保存期間による有意な違いは見られなかった。保存期間毎の FFPE 組織から抽出された DNA の Q スコアに関しては、0.5 年保存および 3 年保存の間と、9 年保存および 12 年保存の間において Q129/Q41 と Q305/Q41 に有意差が見られた。これは、QIA と WAX によって抽出される DNA が共に保存期間の経年に関連して劣化していることを示す。

FFPE 組織由来の断片化 DNA においても EGFR L858R 突然変異は検出可能である

新鮮凍結組織由来の DNA を用いて、25 例中の 5 例で EGFR L858R 突然変異を検出できた。これらの 5 つの EGFR L858R 突然変異の全ては、PCR のプロダクト長を 108bp と極めて短くデザインすることにより、FFPE 組織由来の DNA においても検出できた。このサンプルには 12 年間保存されたサンプルも含まれている。

[考察]

本研究において、我々は WAX と QIA によって FFPE 組織から抽出した DNA の経年変化を評価した。これまでも FFPE 組織から抽出した DNA の評価を行った報告はあるが、使われたサンプルは固定方法および保存状況が厳しく管理されたものであった。我々は、通常の病院において保存される FFPE 組織を使用した上で、紫外線吸収度測定・蛍光強度測定・qPCR の 3 つの方法で DNA の経年変化を評価した。ホルマリン固定の長さは様々であり（週末の場合は 2 日）、FFPE のブロックは時折研究室外に貸し出されていた。このような条件下のため、これらの FFPE 組織から得られた DNA の質は通常、制御されたサンプルと比較して不安定であった。しかし、故に本研究のデータは一般的な臨床病院で保存される FFPE 組織の実際の状態を反映していると考えられる。

DNA 濃度の定量化のための従来法は 260nm の紫外線吸収度測定であるが、これは RNA やタンパク質と塩の存在などの多くの要因によって影響を受ける。タンパク質の紫外線吸収度が 280nm であることが既知なので、A260/280 によって DNA の純度が反映されることが知られている。本研究において、WAX によって抽出された DNA の A260/280 平均値は約 1.1 であった。WAX によって抽出された DNA が QIA よりも多くのタンパク質などの不純物を含んでいたのに対し、QIA は二酸化ケイ素膜を利用して DNA を精製するもので、二酸化ケイ素膜と結合したもののみ抽出でき、膜に結合しきれなかった DNA は廃棄されるため、得られる量が減少している、と考えられる。また、蛍光強度測定において使用した PicoGreen は比較的不純物の影響を受けにくい、断片化によって収量は過小評価される傾向がある。本研究において、WAX によって抽出される DNA が、QIA によって抽出した DNA よりも断片化されたものであることが分かった。WAX の DNA 収率は紫外線吸収度測定と蛍光強度測定法の両者において QIA より高かったため、WAX の DNA 絶対的な収量は QIA よりも高いと考えられる。

抽出した DNA は、その後は主に PCR をベースとした分析が行われる。故に、qPCR 法で得られる結果は、分析に使用できる量としての DNA を他の方法よりも反映する可能性がある。本研究において、WAX による DNA 収率は短い DNA 長のものにおいて QIA による収率よりも高かった。最近では、断片化した DNA でも使用可能となってきており、限られた FFPE のサンプルからでも十分な DNA 収率を得ることが重要である。したがって、WAX による DNA 収率の高さは、QIA に勝る利点かもしれない。反対に、DNA の純度は、QIA によって得られた DNA の方が WAX によるものよりも高く、断片化も少なかった。つまり、得られる DNA の質に着目すると、QIA は WAX よりも優れていた。

FFPE 組織の長期保存による悪影響はないかもしれないという報告が散見されるが、アデマらは、経年によりパラフィンブロックから得られる増幅可能な DNA は減少すると報告している。

本研究において、FFPE 組織の長期保存が DNA の量または純度を減少させないことを示したが、経年により断片化されることも示された。これは両者の報告を裏付けるものである。少なくとも一般病院のサンプルにおいては、DNA の経年に伴う断片化の問題を抽出方法で補うことが難しいということを示唆する。短い期間の保存であったとしても、今回の研究で得られた DNA の Q スコアは低かったが、次世代シーケンスを行う場合の DNA は Q スコアで 0.4 以上であることが推奨されている。一方で、新鮮凍結組織由来の DNA を用いて EGFR L858R 突然変異を検出した 5 つの症例で、FFPE 組織由来の DNA においても検出できた。このサンプルには 12 年間保存されたサンプルも含まれている。これらの事実から、臨床 FFPE 組織を用いて DNA を抽出して通常の PCR ベースのダイレクトシーケンスを行うには有用であることが示されたが、通常の次世代シーケンスを行うことは困難であることが予想される。

[結論]

FFPE 組織サンプルからの WAX による全 DNA 抽出法は収率の点で利点があり、QIA による二酸化ケイ素膜-結合法は得られる DNA の質で利点を示した。また、経年的に FFPE 組織から得られる DNA は断片化され、解析には制限がある可能性がある。